ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202112.00154v1

CBL-CIPK 信号系统参与小桐子抗冷性形成的生物信息学分析

王海波[1,2*]，李芙蓉[1]，杨金翠[1]，郭俊云[1]

(1. 曲靖师范学院 生物资源与食品工程学院，云南 曲靖 655011; 2. 曲靖师范学院 云南省高校云贵高原动植物遗传多样性及生态适应性进化重点实验室，云南 曲靖 655011)

摘 要：类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白（calcineurin B-like calcium sensor，CBL）属 Ca^{2+}结合蛋白，通过与类钙调磷酸酶 B 亚基互作蛋白激酶（calcineurin B-like calcium sensor interacting protein kinase，CIPK）互作介导 Ca^{2+}信号转导过程。CBL-CIPK 信号系统参与了植物对多种逆境胁迫的响应过程。为深入探讨小桐子抗冷性的机制，该研究基于序列比对的方法，在全基因组水平对小桐子 *CBL* 与 *CIPK* 基因家族进行鉴定，并对其系统进化、基因结构、表达特性及功能互作进行了解析。结果表明：（1）在小桐子基因组中共鉴定到 8 个 *CBL* 基因与 18 个 *CIPK* 基因，CBL 与 CIPK 蛋白长度分别在 211~257 aa 与 422~484 aa 之间，等电点分别在 4.65~5.08 与 6.20~9.26 之间。（2）另外，*CBL* 基因家族都包含 8~10 个外显子，而 *CIPK* 基因家族分为显著的 1~2 个外显子（11 个基因）与 12~15 个外显子（7 个基因）两类。（3）多序列比对显示，小桐子 CBL 蛋白都鉴定到 1 个由 14 个氨基酸残基组成的非典型 EF-hand 基序与 3 个取代程度不同的典型 EF-hand 基序，而 CIPK 蛋白都包含 N 端激酶结构域与 C 端自抑制 FISL/NAF 结构域。（4）染色体定位显示，26 个小桐子 *CBL* 与 *CIPK* 基因不均匀地分布于 9 条染色体上。（5）转录组数据分析表明，大部分 *CBL* 与 *CIPK* 基因在小桐子叶片、根及种子中都有高水平表达，其中，*JcCIPK14* 与 *JcCIPK18* 在低温处理时上调表达量达到了极显著水平（P<0.01），参与小桐子的抗冷性过程。以上结果为开展小桐子 *CBL* 与 *CIPK* 基因的功能鉴定与低温信号转导机制研究提供了借鉴。

关键词：小桐子，蛋白激酶，CBL-CIPK，基因家族，表达分析，抗冷性

Bioinformatics analysis of CBL-CIPK signaling system participating in the formation of cold resistance in *Jatropha curcas*

WANG Haibo[1,2*], LI Furong[1], YANG Jincui[1], GUO Junyun[1]

(1. *College of Biological Resource and Food Engineering*, *Qujing Normal University*, Qujing 655011, Yunnan, China; 2. *Key Laboratory of Yunnan Province Universities of the Diversity and Ecological Adaptive Evolution for Animals and Plants on YunGui Plateau*, *Qujing Normal University*, Qujing 655011, Yunnan, China)

Abstract: Calcineurin B-like calcium sensor (CBL) is a Ca^{2+}-binding protein that mediates the Ca^{2+} signal transduction process by interacting with Calcineurin B-like calcium sensor interacting protein kinase (CIPK). CBL-CIPK signaling system is involved in the response of plants to a variety of stress conditions. For insight into the chilling mechanism of *CBL* and *CIPK* in *Jatropha curcas*, the *CBL* and *CIPK* gene families were identified from *J.curcas* based on the BLAST method, and then the phylogenetic relationship, gene structure, expression profile, and functional interaction were analyzed. The results were as follows: (1) A total of 8 *CBL* and 18 *CIPK* genes were identified from *J.curcas* genome. The protein length of CBLs and CIPKs ranged from 211 to 257 aa and 422 to 484 aa, respectively, and the putative isoelectric point ranged from 4.65 to 5.08 and 6.20 to 9.26, respectively. (2) Furthermore, the *CBL* family genes contained 8-10 exons, while the *CIPK* family genes were divided into 1-2 exons (11 genes) and 12-15 exons (7 genes). (3) Sequence alignment revealed that CBL proteins

基金项目：云南省地方本科高校（部分）基础研究联合专项项目（202001BA070001-003）；云南省大学生创新创业训练计划项目（202010684038）；国家自然科学基金（31460179）[Supported by the Yunnan Local Colleges Applied Basic Research Project (202001BA070001-003); the Training Program of Yunnan Undergraduate on Innovation and Entrepreneurship (202010684038); the National Natural Science Foundation of China (31460179)]。

作者简介：王海波（1980-），男，山西长治人，博士，教授，研究方向为植物逆境分子生物学，(E-mail) bocai0406@163.com。

*通信作者

identified 1 atypical EF-hand motif consisting of 14 amino acid residues and 3 typical EF-hand motifs with different substitution, while CIPK proteins contained kinase domains in N-terminal and self-inhibiting FISL/NAF domains in C-terminal. (4) Chromosome mapping analysis indicated that 26 *J.curcas CBL* and *CIPK* genes were distributed with different densities on 9 chromosomes. (5) Transcriptome data analysis showed that most of the *CBL* and *CIPK* genes were highly expressed in *J.curcas* leaves, roots, and seeds. Among them, the up-regulated expression of *JcCIPK14* and *JcCIPK18* reached significant levels under cold stress, which was involved in the cold resistance of *J.curcas*. The results of this study might lay a significant foundation for further studies on the gene function and chilling signaling transduction mechanism of *CBL* and *CIPK* gene families in *J.curcas*.

Key words: *Jatropha curcas*, protein kinase, CBL-CIPK, gene family, expression analysis, cold resistance

蔗糖非发酵-1型相关蛋白激酶SnRK（sucrose non-fermenting-1 related protein kinase）是广泛存在于植物中的丝氨酸/苏氨酸（Ser/Thr）类蛋白激酶家族。根据氨基酸序列聚类结果，SnRK家族分为SnRK1、SnRK2、SnRK3三个亚家族。SnRK3又称为类钙调磷酸酶B亚基互作蛋白激酶CIPK（calcineurin B-like calcium sensor interacting protein kinase）(Shi et al., 1999; Kim et al., 2000) 或盐过敏感蛋白SOS（salt overly sensitive）(Ji et al., 2013)，类钙调磷酸酶B亚基蛋白CBL（calcineurin B-like calcium sensor）是CIPK的直接上游互作蛋白，也能够感知胞内Ca^{2+}信号，共同组成Ca^{2+}-CBL-CIPK级联信号系统，参与植物渗透、高盐、低温、高温等非生物逆境胁迫的响应过程(Li et al., 2009; Sanyal et al., 2016)。作为Ca^{2+}受体蛋白，CBL都含有4个保守性不同的“螺旋-环-螺旋”（helix-loop-helix，HLH）EF手型（EF-hand）基序，是Ca^{2+}结合所必需的(Weinl & Kudla, 2009)，同时，部分CBL蛋白N端还具有脂类修饰的N-豆蔻酰化（N-Myristoylation）或N-棕榈酰化（N-Palmitoylation）位点，辅助该蛋白的跨膜转运(Batistic et al., 2008)。CIPK蛋白N端激酶结构域中都包含1个激活环（activation-loop）基序，位于-DFG-与-APE-序列之间，其中，3个高度保守的Ser、Thr、Tyr残基是激酶活性发挥所必须的(Guo et al., 2001)，而C端负责调控激酶结构域的催化活性，其中，由21或24个氨基酸残基组成的FISL（Phe-Ile-Ser-Leu）/NAF（Asn-Ala-Phe）结构域是CIPK与CBL结合的核心序列(Du et al., 2011)，正常情况下，FISL/NAF结构域与N端激酶结构域互作从而具有自抑制作用，当结合Ca^{2+}而被激活的CBL蛋白与FISL/NAF结构域结合后，可以解除FISL/NAF结构域对激酶结构区的抑制作用，从而表现出激酶活性(Akaboshi et al., 2008)。另外，C端还包含1个由37个氨基酸残基组成的PPI（protein phosphatase interaction）结构域，决定与CIPK结合的蛋白磷酸酶PP2C（protein phosphatase 2C）的种类，也竞争性将CBL蛋白脱离FISL/NAF结构域，使CIPK回到自抑制状态(Ohta et al., 2003)。

目前，已经对多种植物在全基因组水平进行了*CBL*与*CIPK*基因的鉴定，*CBL*基因家族包括：拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）10个(Kolukisaoglu et al., 2004)、水稻（*Oryza sativa*）10个(Kolukisaoglu et al., 2004)、玉米（*Zea mays*）10个(李利斌等, 2010)、杨树（*Populus trichocarpa*）10个(Zhang et al., 2008)、小麦（*Triticum aestivum*）7个(Sun et al., 2015)、油菜（*Brassica napus*）7个(Zhang et al., 2014)、茄子（*Solanum melongena*）5个(Li et al., 2016)等；*CIPK*基因家族包括：拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）25个(Kolukisaoglu et al., 2004)、水稻（*Oryza sativa*）33个(Kolukisaoglu et al., 2004; Kanwar et al., 2014)、玉米（*Zea mays*）43个(Chen et al., 2011)、杨树（*Populus trichocarpa*）27个(Yu et al., 2007)、小麦（*Triticum aestivum*）20个(Sun et al., 2015)、大豆（*Glycine max*）52个(Zhu et al., 2016)、油菜（*Brassica napus*）23个(Zhang et al., 2014)、茄子（*Solanum melongena*）15个(Li et al., 2016)、苹果（*Malus domestica*）34个(Niu et al., 2018)、葡萄（*Vitis vinifera*）16个(路志浩等, 2017)、番茄（*Lycopersicon esculentum*）22个(王傲雪和刘思源, 2018)等。小桐子（*Jatropha curcas*）属大戟科（Euphorbiaceae）麻疯树属（*Jatropha* Linnaeus）多年生落叶小型乔木，原产中南美洲地区(Lin et al., 2004)。作为重要的木本油料植物，小桐子种子含油量高达35%~60%，适应各种柴油发动机，且关键技术指标达到了欧IV标准，具有广阔的开发利用前景(Makkar & Becker, 2009)。目前，对于小桐子*CBL*与*CIPK*家族的基因鉴定及互作分析还未见报道。本研究基于小桐子基因组信息(Sato et al., 2011)，利用生物信息学方法鉴定小桐子*CBL*与*CIPK*基因，并对其理化性质、基因结构、蛋白基序、系统进化、低温表达及功能互作进行了分析，以期为研究小桐子*CBL*与*CIPK*基因家族的抗逆信号转导机制奠定基础。

1 材料与方法

chinaXiv:202112.00154v1

1.1 小桐子*CBL*与*CIPK*基因家族的鉴定

根据Kolukisaoglu et al.(2004)、Zhang et al.(2008)、Yu et al.(2007)鉴定的模式植物拟南芥、水稻及小桐子近科物种杨树的*CBL*与*CIPK*基因家族序列，从TAIR数据库（https://www.arabidopsis.org/）下载拟南芥10个*CBL*基因与25个*CIPK*基因的蛋白序列，从PlantBiology数据库（http://rice.plantbiology.msu.edu/）下载水稻 10 个 *CBL* 基因与 33 个 *CIPK* 基因的蛋白序列，从 Phytozome 数据库（https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html）下载杨树10个*CBL*基因与27个*CIPK*基因的蛋白质序列，通过ClustalX进行多重序列比对，利用Hmmer3.0软件的Hmmbuild程序将比对文件生成CBL与CIPK结构域的隐马可夫HMM模型。同时，分别从GenBank（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/915/）与Kazusa（http://www.kazusa.or.jp/jatropha/）(Sato et al., 2011)下载小桐子最新注释蛋白质数据库，利用NCBI的Makeblastdb程序将该数据库本地化。利用NCBI Blast程序对小桐子蛋白质数据库进行本地BlastP相似性比对（阈值E<1e-10，序列相似性>50%），得到初步筛选的小桐子CBL与CIPK蛋白质序列。通过序列自对比（self-blast）去除重复序列，将非冗余的候选序列利用Pfam（http://pfam.sanger.ac.uk/）与CDD（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）在线工具分析CBL的EF-hand基序与CIPK的蛋白激酶结构域（protein kinase domain）做进一步筛选，得到小桐子CBL与CIPK家族蛋白序列。同时下载其对应的基因序列与mRNA序列用于后续基因结构分析。

1.2 小桐子*CBL*与*CIPK*基因家族的序列分析

利用 ExPaSy 提供的在线工具 ProtParam（http://web.expasy.org/protparam/）对小桐子 CBL 与 CIPK 进行氨基酸数目、理论分子量（Mw）、等电点（pI）等基本参数的分析。将鉴定的小桐子 CBL 与 CIPK 蛋白序列与拟南芥、水稻及杨树的 CBL 与 CIPK 蛋白序列利用 ClustalX 进行序列相似性比对，然后用 MEGA6.0 软件通过邻接法（NJ）构建系统进化树，并采用自展法（bootstrap）进行检验。同时，利用 GenDOC 软件对 ClustalX 比对结果进行 CBL 与 CIPK 蛋白保守结构域分析。另外，通过 CDS 序列（coding sequence）与基因序列比对以确定 *CBL* 与 *CIPK* 基因内含子与外显子的结构，并利用 GSDS（gene structure display server，http://gsds.cbi.pku.edu.cn/）绘制基因结构图。另外，染色体定位以 Wu et al.(2015)构建的小桐子遗传连锁图谱进行锚定，并通过 MapChart（version2.1）绘制基因定位图。利用 STRING（http://string-db.org）进行 CBL 与 CIPK 蛋白的信号互作网络分析（设置可信度大于 0.7）。

1.3 小桐子*CBL*与*CIPK*基因家族的表达分析

从 GenBank 的 SRA 数据库下载小桐子不同器官的 Illumina 高通量测序数据（叶片 SRR1639660、根 SRR1639659、种子 SRR1639661）。通过 Bowtie2 与 Samtools 工具将鉴定到的小桐子 *CBL* 与 *CIPK* 家族基因与测序数据进行比对，得到各 *CBL* 与 *CIPK* 基因的表达 reads 数据，之后通过 Cufflinks 程序计算每个基因的表达量 FPKM（fragments per kilobase per million）值，进行以 2 为底的对数转化，并设置以基因与器官同时进行聚类，聚类方法选择层次聚类法（hierarchical clustering）。另外，以我们前期小桐子转录组(Wang et al., 2014)与数字基因表达谱（digital gene expression，DGE）(Wang et al., 2013)数据为基础，提取对照与 12 °C 低温处理 12、24、48 h 的 *CBL* 与 *CIPK* 基因的原始 Clean Taq 数据，通过 TPM（transcript per million clean tags）获得标准化的基因表达量(Thoen et al., 2008; Morrissy et al., 2009)，得到小桐子 *CBL* 与 *CIPK* 家族基因在低温处理下的差异表达数据。利用 R 软件（version3.4.1）的 gplots 与 pheatmap 函数进行聚类分析热图（heatmap）的绘制。

2 结果与分析

2.1 小桐子*CBL*与*CIPK*的鉴定及序列特征

通过同源序列比对检索，在小桐子基因组中共鉴定到 8 个 *CBL* 基因（*JcCBL1~JcCBL8*）与 18 个 *CIPK* 基因（*JcCIPK1~JcCIPK18*）（表 1）。通过 ExPASy 工具对小桐子 *CBL* 与 *CIPK* 家族基因进行理化参数的分析，结果表明，*CBL* 家族基因长度分布在 2 172 bp（*JcCBL7*）~9 344 bp（*JcCBL2*）之间，蛋白质序列长度分布在 211 aa（JcCBL8）~257 aa（JcCBL7）之间，等电点全部显强酸性，分布在 4.59（JcCBL5）~5.08（JcCBL4）之间。另外，*CIPK* 家族基因长度分布在 1 522 bp（*JcCIPK16*）~9 348 bp（*JcCIPK9*）之间，蛋白质序列长度分布在 422 aa（JcCIPK16）~484 aa（JcCIPK2）之间，除 JcCIPK9、JcCIPK14、JcCIPK15

chinaXiv:202112.00154v1

及 JcCIPK17，等电点全部呈强碱性，分布在 8.03（JcCIPK2）~9.26（JcCIPK4）之间。

表 1 小桐子 *CBL* 与 *CIPK* 基因家族的序列特征

Table 1 Sequence characteristic of *Jatropha curcas CBL* and *CIPK* gene families

基因名称 Gene name	基因编号A Gene IDA	基因长度 Gene length (bp)	mRNA长度 mRNA length (bp)	氨基酸数目 Amino acid (aa)	等电点B pIB	外显子数目 Exon number	染色体定位C ChromosomeC
JcCBL1	105636225	7 811	1 246	226	4.65	10	6
JcCBL2	105642436	9 344	1 453	230	4.72	10	3
JcCBL3	105641144	5 327	1 216	213	4.66	9	3
JcCBL4	105628645	4 765	2 256	222	5.08	9	8
JcCBL5	105638156	2 501	1 320	249	4.59	9	11
JcCBL6	105645647	6 427	1 210	212	4.94	10	9
JcCBL7	105631691	2 172	1 197	257	4.99	9	2
JcCBL8	105646026	2 295	1 456	211	4.73	8	9
JcCIPK1	105648050	3 049	2 148	465	8.89	2	6
JcCIPK2	105649679	4 015	1 968	484	8.03	2	3
JcCIPK3	105639024	2 810	2 170	458	8.92	2	4
JcCIPK4	105649678	1 740	1 740	445	9.26	1	3
JcCIPK5	105633501	2 076	2 076	435	9.22	1	11
JcCIPK6	105649201	3 104	2 168	453	9.13	2	10
JcCIPK7	105634022	6 365	2 346	459	8.98	15	3
JcCIPK8	105637561	2 006	2 006	447	8.60	1	11
JcCIPK9	105637170	9 348	2 323	451	6.56	15	8
JcCIPK10	105630316	1 947	1 947	449	9.06	1	2
JcCIPK11	105642786	5 136	1 995	443	8.65	15	8
JcCIPK12	105639377	8 199	1 907	448	8.83	15	11
JcCIPK13	105638989	1 737	1 737	425	8.76	1	4
JcCIPK14	105630750	5 880	2 117	446	6.54	14	4
JcCIPK15	105643632	4 159	1 931	440	7.22	12	1
JcCIPK16	105648048	1 522	1 522	422	8.78	1	6
JcCIPK17	105628484	4 503	2 249	464	6.20	15	11
JcCIPK18	105632073	1 880	1 880	442	8.74	1	1

注：A 基因编号来自 GenBank 小桐子基因组数据库。B 通过 ExPASy 工具计算蛋白质等电点。C 基于 Wu et al.构建的小桐子遗传连锁图谱进行染色体定位(Wu et al., 2015)。

Note: AGene IDs are available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) *Jatropha curcas* (Annotation Realease 101) database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). BProtein characteristics of pI (isoelectric point) was predicted using the ExPASy online service (http://web.expasy.org/protparam/). CChromosomal localization was completed based on the linkage map constructed by Wu et al.(2015).

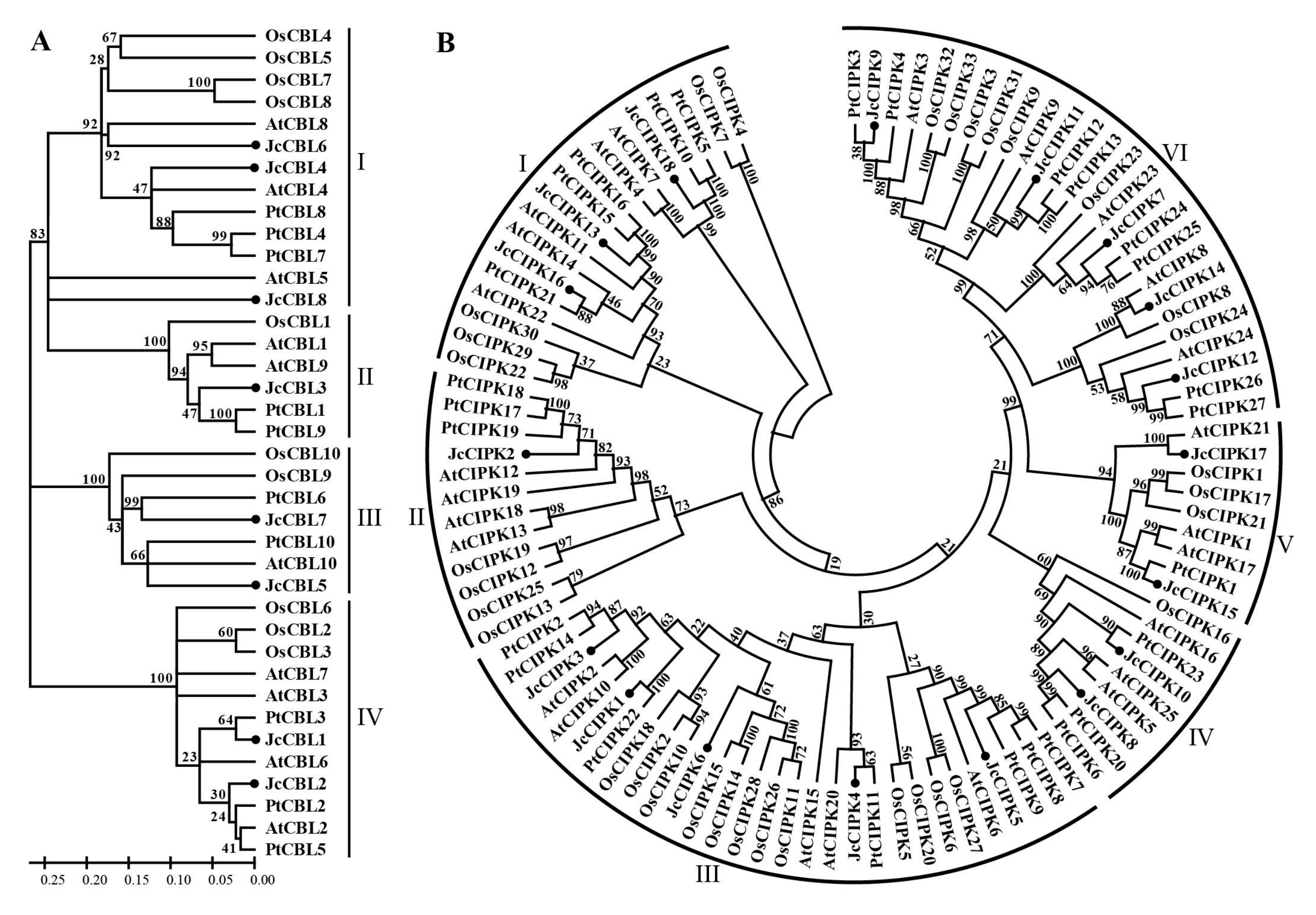
2.2 小桐子*CBL*与*CIPK*基因的系统进化与基因结构

通过MEGA分别构建小桐子与拟南芥、水稻、杨树的*CBL*与*CIPK*基因家族系统进化树（图1），结果表明，*CBL*基因家族聚类为I、II、III、IV四个亚族，小桐子对应基因数量分别为3（*JcCBL4*、*JcCBL6*、*JcCBL8*）、1（*JcCBL3*）、2（*JcCBL5*、*JcCBL7*）、2（*JcCBL1*、*JcCBL2*）（图1: A），与小桐子*CBL*基因家族单独聚类结果吻合（图2: A），其中，*JcCBL3*在单独聚类中与*JcCBL1*、*JcCBL2*距离较近，而在多物种共聚类中则属单独II亚族，与*JcCBL3*基因结构（9个外显子）不同于*JcCBL1*、*JcCBL2*（10个外显子）一致。另外，*CIPK*基因家族共聚类为六个亚族，小桐子对应基因数量分别为3、1、5、2、2、5（图1: B），也与小桐子*CIPK*基因家族单独聚类结果吻合（图2: B）。

结合小桐子*CBL*与*CIPK*基因家族的聚类结果，利用GSDS工具分析其基因结构，结果显示，小桐子*CBL*与*CIPK*基因家族的亚族聚类特性与基因结构吻合。小桐子8个*CBL*基因的外显子数量为8~10个（表1），且都包含5'-UTR与3'-UTR区域，其中，亚族III的*JcCBL5*（2 501 bp）与*JcCBL7*（2 172 bp）都包含9个外显子，

chinaXiv:202112.00154v1

且基因都较短，而亚族IV的*JcCBL1*（7 811 bp）与*JcCBL2*（9 344 bp）都包含10个外显子，且基因都较长（图2: A）。根据文献报道的其他物种*CIPK*基因家族的聚类结果与基因结构关系，小桐子*CIPK*基因家族也都包含5'-UTR与3'-UTR区域，18个基因成员根据基因结构分为两大类，11个*JcCIPK*基因包含1~2个外显子，其中，*JcCIPK4*、*JcCIPK5*、*JcCIPK8*、*JcCIPK10*、*JcCIPK13*、*JcCIPK16*、*JcCIPK18*仅包含1个外显子，而*JcCIPK1*、*JcCIPK2*、*JcCIPK3*、*JcCIPK6*包含2个外显子。另外，7个*JcCIPK*基因包含12~15个外显子，其中，*JcCIPK7*、*JcCIPK9*、*JcCIPK11*、*JcCIPK12*、*JcCIPK17*都包含15个外显子，而*JcCIPK14*与*JcCIPK15*分别包含14个与12个外显子（图2: B）。



A. *CBL* 基因家族; **B.** *CIPK* 基因家族。下同。

A. *CBL* gene family; **B.** *CIPK* gene family. The same below.

图 1 小桐子与拟南芥、水稻及杨树 *CBL* 与 *CIPK* 基因家族的系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic relationship of *Jatropha curcas* with *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, and *Populus trichocarpa* *CBL* and *CIPK* gene families

chinaXiv:202112.00154v1

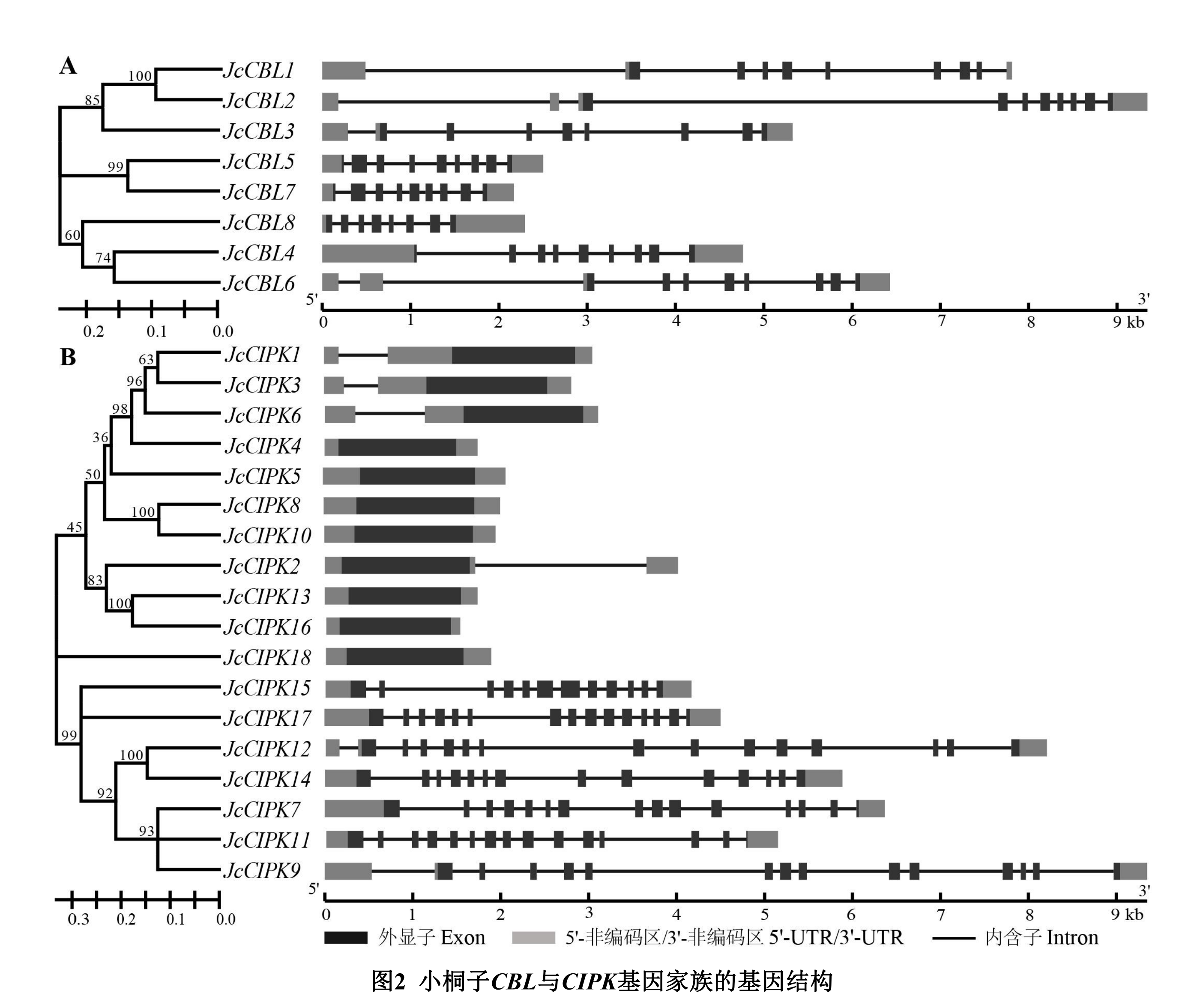


图2 小桐子*CBL*与*CIPK*基因家族的基因结构

Fig. 2 Gene structure features of *CBL* and *CIPK* families in *Jatropha curcas*

chinaXiv:202112.00154v1

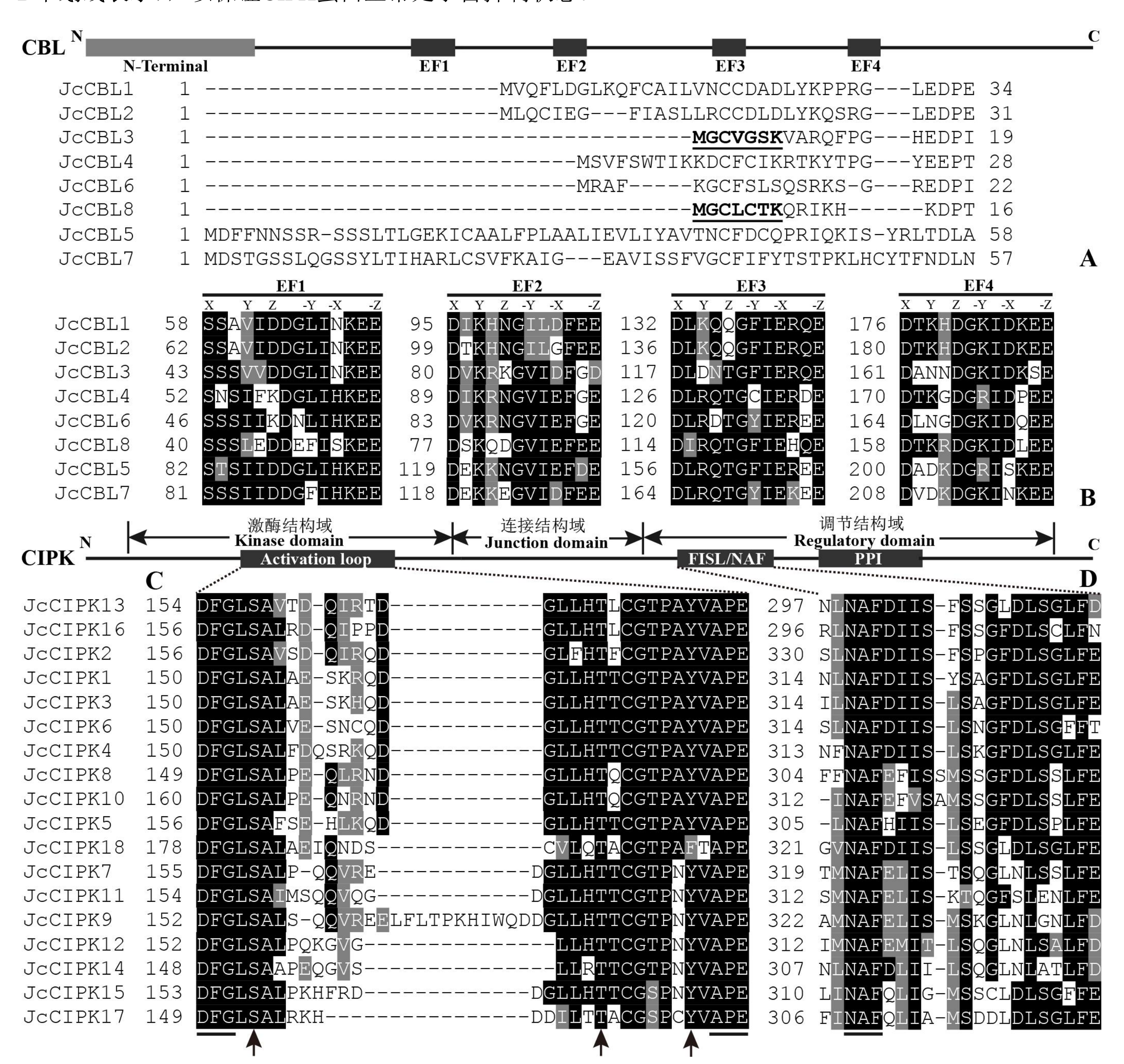
2.3 小桐子CBL与CIPK氨基酸序列及结构域分析

文献报道，CBL蛋白含有4个保守性不同的EF-hand手型基序，螺旋-环-螺旋作为EF-hand的典型结构，中间环（包含12个氨基酸残基，共有序列为-DKDGDGKIDFEE-）的1（X）、3（Y）、5（Z）、7（-Y）、9（-X）、12（-Z）位氨基酸残基较为保守，被认为是CBL蛋白结合Ca^{2+}所必需的（图3: A）。通过分析8个小桐子CBL蛋白的氨基酸序列显示，第一个EF-hand（EF1）都具有14个氨基酸残基，不是典型的EF-hand结构，而第2~4个EF-hand（EF2~4）具有典型的12个氨基酸残基，其中，除1（Asp）和12（Glu）位氨基酸绝对保守外，其他氨基酸位（3、5、7、9位）都发生了部分取代，且EF4、EF3、EF2的氨基酸取代率逐渐增加。另外，第3位Asp（D）在EF2中被Lys（K）取代，在EF3中被Lys（K）与Arg（R）取代，在EF4中被Lys（K）与Asn（N）取代；第5位Asp（D）在EF2中被Asn（N）与Lys（K）取代，在EF3中被Gln（Q）与Asn（N）取代；第7位Lys（K）在EF2中被Val（V）与Ile（I）取代，在EF3中被Phe（F）与Try（Y）取代；第9位Asp（D）在EF2与EF3中都被Glu（E）取代（图3: B）。以上结果显示，EF-hand2~4结构中都被相同类型的氨基酸取代，保证了EF-hand结合Ca^{2+}的能力与多样性。另外，根据N端区域的长度，小桐子CBL家族的JcCBL1、JcCBL2、JcCBL3、JcCBL4、JcCBL6及JcCBL8包含16~34 aa较短的N端序列，且在JcCBL3与JcCBL8 N端鉴定到-MGCXXSK/T-的豆蔻酰化序列，以加强CBL蛋白与膜的结合，而JcCBL5与JcCBL7则包含较长的N端序列（图3: A）。

植物特有的CIPK蛋白也称为SnRK3，该激酶与酵母SNF1、哺乳动物AMPK同源，都具有N端激酶结构域，其中内部激活环（activation-loop）基序发挥核心作用。在小桐子18个CIPK蛋白的N-端都鉴定到被-DFG-

ChinaXiv合作期刊

与-APE-序列（图3: C下划线表示）间隔的激活环基序（图3: C），且都包含保守的Ser、Thr及Tyr氨基酸残基（图3: C箭头所示）。另外，在C端都鉴定到CIPK蛋白21 aa自抑制基序FISL/NAF的保守-NAF-序列（图3: D下划线表示），以保证CIPK蛋白正常处于自抑制状态。



A. 小桐子CBL蛋白N端结构域，下划线表示JcCBL3与JcCBL8的N端豆蔻酰化结构域; **B.** 小桐子CBL蛋白4个EF手型基序序列比对（EF1~4）; **C.** 小桐子CIPK蛋白N端激酶结构域中的功能激活环，箭头表示保守的Ser、Thr、Tyr残基; **D.** 小桐子CIPK蛋白FISL/NAF结构域。

A. N-terminal domain of *J.curcas* CBL proteins, N-Myristoylation domains of JcCBL3 and JcCBL8 were underlined; **B.** Sequence alignment of CBL EF-hand (EF1-4) in *J.curcas*; **C.** Activation loop within N-terminal kinase domain in *J.curcas* CIPK protein was presented, conserved amino acid residues of Ser, Thr, and Tyr were marked by arrows; **D.** FISL/NAF domain of *J.curcas* CIPK proteins.

图3 小桐子CBL与CIPK结构域序列比对

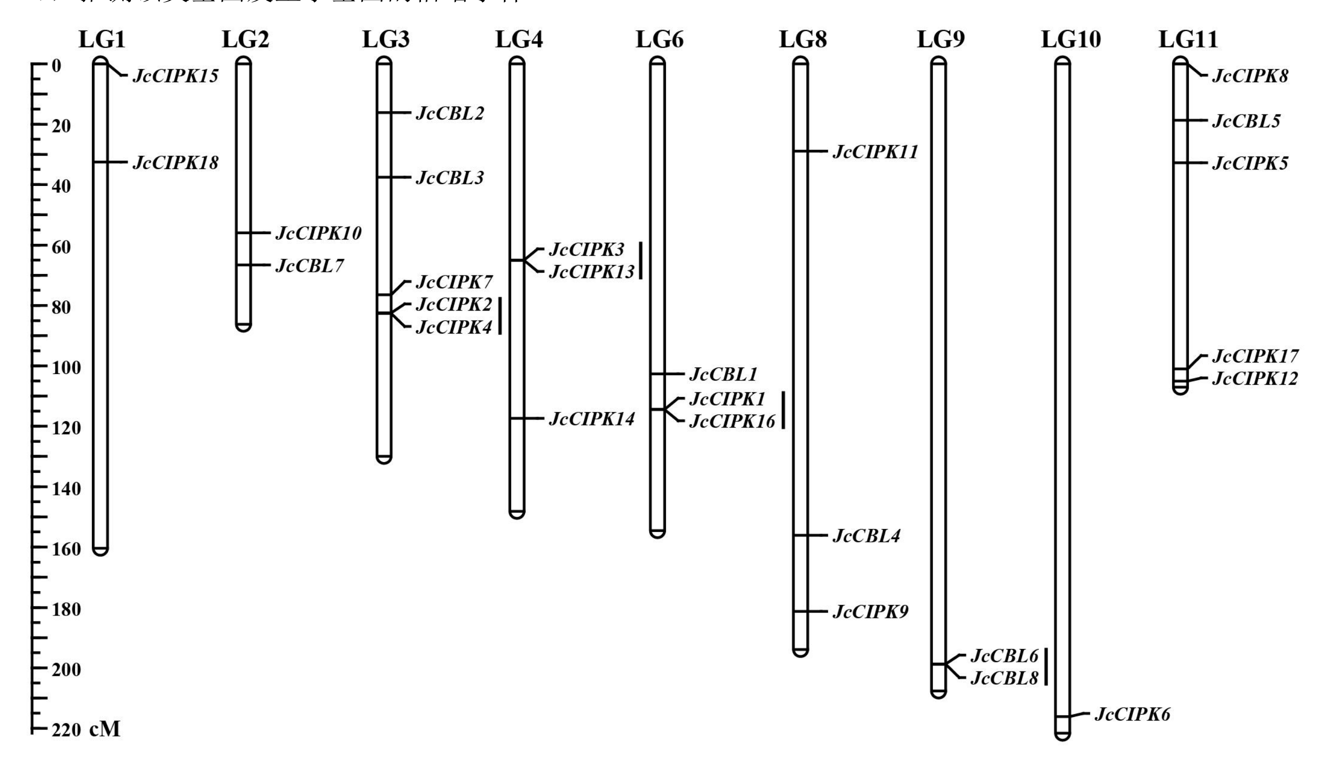
Fig. 3 Sequence alignment of *Jatropha curcas* CBL and CIPK domains

2.4 小桐子 *CBL* 与 *CIPK* 基因家族的染色体定位

依据Wu et al.(Wu et al., 2015)构建的小桐子高密度遗传连锁图谱，在染色体水平定位小桐子*CBL*与*CIPK*基因，结果表明，除5号与7号染色体没有基因分布外，26个小桐子*CBL*与*CIPK*基因不均匀地分布于9

chinaXiv:202112.00154v1

条染色体上，其中，3号与11号染色体上的基因数量最多5个，而10号染色体上的基因数量最少，仅包含1个*JcCIPK6*基因，进一步鉴定到9号染色体上*CBL*基因家族的串联复制基因*JcCBL6*/*JcCBL8*，以及3号、4号、6号染色体上*CIPK*基因家族的串联复制基因*JcCIPK2*/*JcCIPK4*、*JcCIPK3*/*JcCIPK13*、*JcCIPK1*/*JcCIPK16*（图4），推测该类基因发生了基因的倍增事件。



竖线表示基因串联复制; 刻度表示厘摩; LG 表示染色体。

The vertical line indicates tandem duplication; The scale is in centiMorgans (cM); LG means chromosome.

图 4 小桐子 *CBL* 与 *CIPK* 基因家族的染色体定位

Fig. 4 Chromosomal localization of *Jatropha curcas CBL* and *CIPK* gene families

2.5 小桐子*CBL*与*CIPK*基因的差异表达分析

基于GenBank小桐子转录组数据，通过Cufflinks程序得到小桐子*CBL*与*CIPK*基因家族26个基因的器官表达数据（图5）。结果表明，除*JcCBL6*与*JcCBL8*在种子中没有表达外，其他24个小桐子*CBL*与*CIPK*基因在叶片、根及种子中都有表达。其中，*JcCBL2*、*JcCIPK1*、*JcCIPK3*、*JcCIPK5*、*JcCIPK7*、*JcCIPK8*、*JcCIPK13*、*JcCIPK18*在三种器官中表达量都较高（log_2FPKM>3.5），其中，*JcCIPK5*在三种器官中表达量都最高，推测在小桐子Ca^{2+}-CBL-CIPK信号转导系统中处于核心地位。其它基因存在器官表达特异性，*JcCIPK4*在叶片中表达量较高，而在种子中表达量较低，*JcCBL7*只在根中表达，而在叶片与种子中表达量甚微，而*JcCBL4*在叶片与根中表达量较高，而在种子中基本没有表达（图5）。

通过DGE数据分析得到9个小桐子*CBL*与*CIPK*家族基因在低温处理条件下的表达数据（图6）。与对照相比，*JcCIPK14*与*JcCIPK18*在12 °C低温处理12 h、24 h、48 h时上调表达量都达到了极显著水平（$P<0.01$），与小桐子的抗冷性直接相关。另外，*JcCIPK4*与*JcCIPK16*随着低温处理时间的延长，表达量也在逐渐提高，在低温处理48 h时，分别较对照上调表达9.92倍（$P<0.01$）与2.10倍。同时，*JcCIPK1*与*JcCIPK2*是响应低温较快的基因，都在低温处理12 h就达到最大表达量，分别较对照上调表达5.21倍与2.87倍，之后表达量逐渐下调（图6）。

chinaXiv:202112.00154v1

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202112.00154v1

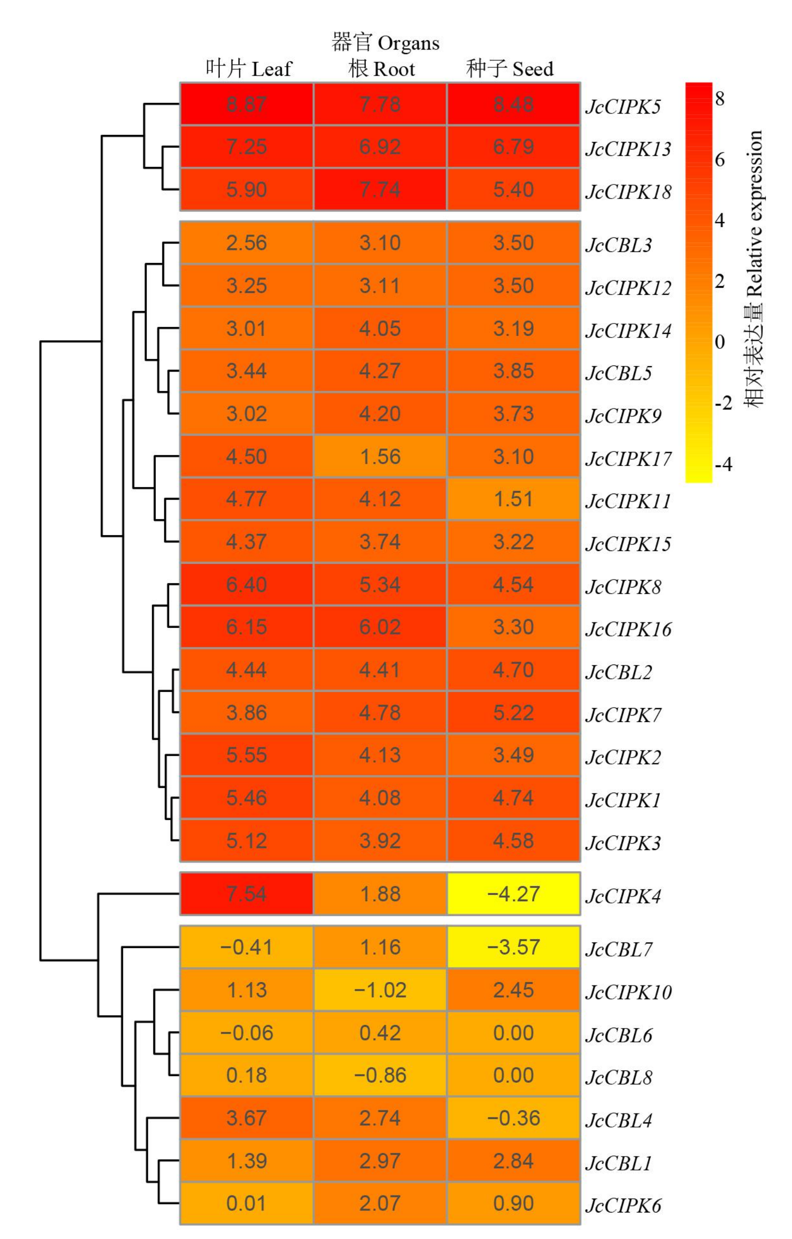


图 5 小桐子 *CBL* 与 *CIPK* 家族基因的器官差异表达分析

Fig. 5 Differential expression of *Jatropha curcas CBL* and *CIPK* gene families in different organs

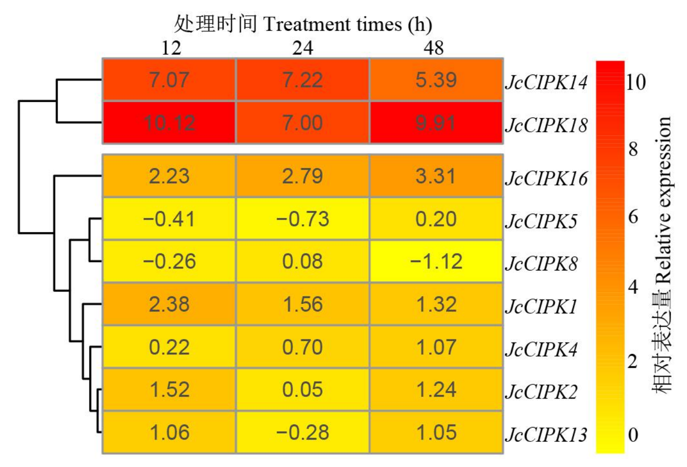


图 6 小桐子 *CBL* 与 *CIPK* 家族基因的低温处理表达分析

Fig. 6 Expression profiles of *Jatropha curcas CBL* and *CIPK* gene families under chilling stress

2.6 小桐子CBL与CIPK蛋白的互作网络解析

基于小桐子、拟南芥CBL与CIPK同源蛋白，通过STRING 10.5进行蛋白互作网络分析，以解析其参与的信号转导途径以及可能的潜在功能。结果表明，在可信度为0.7的情况下，除JcCIPK1、JcCIPK3、JcCIPK4、JcCIPK6外，另外8个JcCBLs与14个JcCIPKs都参与了典型的CBL-CIPK信号转导途径，且表现出一对多与多对一的互作模式。其中，JcCBL1/2、JcCBL3分别可以与12个、10个JcCIPKs互作结合，推测两者在Ca^{2+}-CBL-CIPK信号网络中可能发挥关键作用，而JcCBL6只能与JcCIPK7、JcCIPK16互作结合。同时，JcCIPK7可以与所有8个小桐子JcCBLs结合，而JcCIPK17与JcCIPK18仅可与JcCBL1/2结合（图7）。

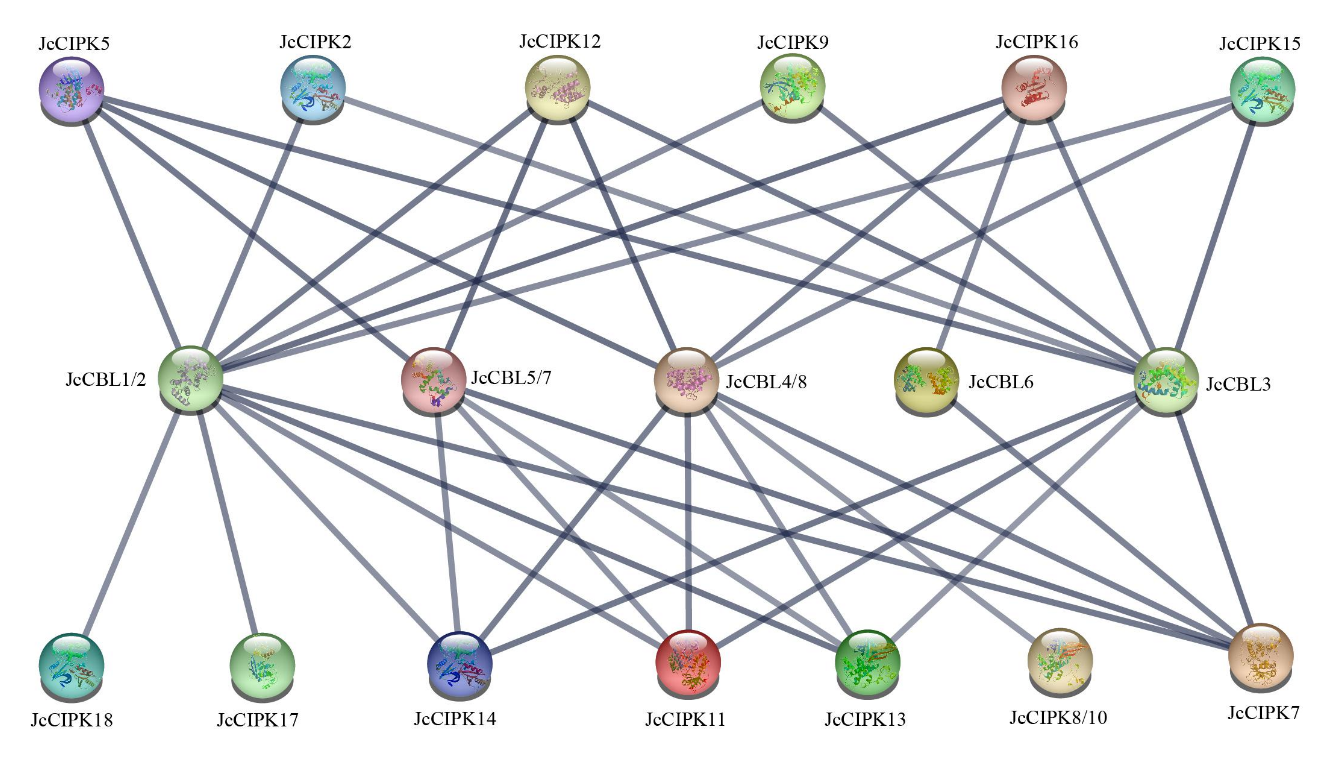


图7 小桐子与拟南芥同源CBL与CIPK蛋白的互作网络分析

Fig. 7 Interaction network analysis of CBL and CIPK proteins identified in *Jatropha curcas* and homologous proteins in *Arabidopsis thaliana*

3 讨论

传递类 Ca^{2+}结合蛋白 CBL 通过解码与感知 Ca^{2+}浓度与分布的变化(Scrase-Field & Knight, 2003; Batistic & Kudla, 2012)，并特异结合下游 CIPK 蛋白共同组成 Ca^{2+}-CBL-CIPK 信号系统参与小桐子的抗冷性过程(Sanders et al., 2002)。本研究在小桐子全基因组共鉴定到 8 个 *CBL* 基因与 18 个 *CIPK* 基因，其蛋白长度、基因结构都较为保守，尤其 CBL 与 CIPK 蛋白的等电点都具有显著的家族特异性，CBL 蛋白等电点都呈酸性，而 CIPK 蛋白等电点大部分都呈碱性（表 1），即生理 pH 环境条件下，这两类互作蛋白带相反的电荷，预示静电库伦力在 CBL 蛋白结合 CIPK 蛋白 FISL/NAF 结构域中可能发挥重要的作用。同时，酵母双杂交实验表明，小桐子与拟南芥 CBL 与 CIPK 互作结合还表现出交叉性与偏好性(Kim et al., 2000; Guo et al., 2001)，如小桐子 JcCBL1/2 可以与 12 个 JcCIPKs 结合，而 JcCIPK7 可以与所有鉴定的小桐子 JcCBLs 结合，另外，JcCIPK17 与 JcCIPK18 偏好结合 JcCBL1/2，而 JcCIPK8/10 则偏好结合 JcCBL4/8（图 7）。与本研究结果类似，拟南芥 AtCIPK7/17 偏好结合 AtCBL9; AtCIPK24 偏好结合 AtCBL4; AtCIPK9 偏好结合 AtCBL2 (Kim et al., 2000)。研究表明，这种特异性与偏好性，主要由 CBL 蛋白的 EF 手型基序决定的 Ca^{2+}结合能力(Nagae et al., 2003; Sanchez-Barrena et al., 2005)、CIPK 蛋白的 FISL/NAF 结构域及其两侧序列结构差异性决定(Kim et al., 2000; Guo et al., 2001; Halfter et al., 2000)。与典型的 12 个氨基酸残基 EF 手型基序不同，8 个小桐子 CBL 蛋白的第一个 EF 手型基序都由 14 个氨基酸残基组成，较其它三个 EF 手型基序都变异较大，且 Asp（D）多被 Ser（S）取代（图 3: B），推测该基序决定了小桐子 CBL 蛋白与 Ca^{2+}不同的亲和力，赋

chinaXiv:202112.00154v1

予小桐子 CBL 蛋白同时解码不同 Ca^{2+}信号的能力(Weinl & Kudla, 2009; Sanchez-Barrena et al., 2007)。当 CIPK 蛋白的 FISL/NAF 结构域结合 CBL 后，导致 CIPK 激酶结构域中激活环保守氨基酸磷酸化而被激活(Weinl & Kudla, 2009)。本研究中小桐子 CIPK 蛋白激活环都位于保守的-DFG-与-APE-之间，且都鉴定到三个保守磷酸化的 Ser（S）、Thr（T）及 Tyr（Y）残基（图 3:C）作为激活位点。

从低等到高等植物，CBL-CIPK 信号系统进化与植物的环境适应性如生物与非生物胁迫是协同的(Weinl & Kudla, 2009)。小桐子起源热带，具备较强的抗旱、抗盐能力，但对低温环境耐受力有限。CBL-CIPK 信号系统的研究始于拟南芥高盐超敏感 SOS 途径（salt overly sensitive），当拟南芥遭受高盐胁迫时，AtCBL4（SOS3）、AtCBL10 结合 Ca^{2+}，再与 AtCIPK24（SOS2）结合形成蛋白复合体，通过 AtCBL4/10-AtCIPK24 途径调控细胞膜与液泡膜上 Na^+-K^+逆转运蛋白（SOS1），将过量的 Na^+泵动至胞外或区隔化至液泡中，从而抵抗或减轻高盐胁迫的伤害(Zhu, 2002; Quan et al., 2007)，根据拟南芥同源蛋白比较，小桐子对应的 SOS 级联途径为 JcCBL4/5/7-JcCIPK12（图 7）。基于同样的方法，本研究还鉴定到小桐子抗旱信号途径 JcCBL3-JcCIPK15（图 7），而对应拟南芥通过 AtCBL1/9-AtCIPK1 信号途径进行感知，并促进 *CBF* 家族基因表达，进而实现渗透平衡，以达到抗旱的目的(Dangelo et al., 2006)。作为低温敏感植物，小桐子在低温环境下，同样会启动 CBL-CIPK 信号系统，并传递至下游抗冷相关转录因子或关键限速蛋白的基因。本研究中，通过小桐子 12 °C 低温处理转录组数据，也鉴定到与小桐子抗冷性密切相关的 *JcCIPK14* 与 *JcCIPK18*（图 6），成为后续克隆与抗冷性功能鉴定的重要候选基因。文献报道，低温胁迫下，拟南芥通过 AtCBL1-AtCIPK3 感知将信号传递至下游抗冷性相关转录因子如 RD29A (Kim et al., 2003)，而水稻和玉米分别通过 OsCIPK3 与 ZmCIPK3 作用于渗透相关基因，通过提高转基因株系的脯氨酸和可溶性糖含量，进而提高其抗冷性(Xiong et al., 2007; 边鸣镝等, 2008)，说明以上转录因子与代谢途径是验证小桐子 CBL-CIPK 低温信号途径下游作用机制的主要研究方向。

chinaXiv:202112.00154v1

参考文献：

AKABOSHI M, HASHIMOTO H, ISHIDA H, et al., 2008. The crystal structure of plant-specific calcium-binding protein AtCBL2 in complex with the regulatory domain of AtCIPK14 [J]. J Mol Bio1, 377(1): 246-257.

BATISTIC O, KUDLA J, 2012. Analysis of calcium signaling pathways in plants [J]. BBA-Biomembranes, 1820 (8): 1283-1293.

BATISTIC O, SOREK N, SCHULTKE S, et al., 2008. Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca^{2+} signaling complexes in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 20(5): 1346-1362.

BIAN MD, LI WL, GUO QX, et al., 2008. cDNA cloning and expression characteristics of maize protein kinase gene *ZmIPK3* in response to abiotic stress [J]. J Maize Sci, 16(6): 52-57. [边鸣镝，李文亮，郭庆勋，等, 2008. 非生物胁迫诱导的玉米蛋白激酶基因 *ZmCIPK3* 的 cDNA 克隆和表达特性 [J]. 玉米科学, 16(6): 52-57.]

CHEN X, GU Z, XIN D, et al., 2011. Identification and characterization of putative *CIPK* genes in maize [J]. J Genet Genomics, 38(2): 77-87.

DANGELO C, WEINL S, BATISTIC O, et al., 2006. Alternative complex formation of the Ca^{2+}-regulated protein kinase CIPK1 control abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 48(6): 857-872.

DU W, LIN H, CHEN S, et al., 2011. Phosphorylation of SOS3-like calciumbinding proteins by their interacting SOS2-like protein kinases is a common regulatory mechanism in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 156 (4): 2235-2243.

GUO Y, HALFTER U, ISHITANI M, et al., 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance [J]. Plant Cell, 13(6): 1383-1399.

HALFTER U, ISHITANI M, ZHU JK, 2000. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium binding protein SOS3 [J]. P Natl Acad Sci USA, 97(7): 3735-3740.

JI H, PARDO JM, BATELLI G, et al., 2013. The salt overly sensitive (SOS) pathway: Established and emerging

chinaXiv:202112.00154v1

roles [J]. Mol Plant, 6(2): 275-86.
KANWAR P, SANYAL SK, TOKAS I, et al., 2014. Comprehensive structural, interaction and expression analysis of CBL and CIPK complement during abiotic stresses and development in rice [J]. Cell Calcium, 56(2): 81-95.
KIM KN, CHEONG YH, GRANT JJ, et al., 2003. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 15(2): 411-423.
KIM KN, CHEONG YH, GUPTA R, et al., 2000. Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases [J]. Plant Physiol, 124(4): 1844-1853.
LI LB, LIU KC, WANG DF, et al., 2010. Bioinformatics analysis on maize *CBL* genes [J]. J Maize Sci, 18(1): 6-11. [李利斌，刘开昌，王殿峰，等, 2010. 玉米 *CBL* 基因的生物信息学分析 [J]. 玉米科学, 18(1): 6-11.]
LI J, JIANG MM, REN L, et al., 2016. Identification and characterization of *CBL* and *CIPK* gene families in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Mol Genet Genomics, 291(4): 1769-1781.
LI R, ZHANG J, WEI J, et al., 2009. Functions and mechanisms of the CBL-CIPK signaling system in plant response to abiotic stress [J]. Prog Nat Sci, 19(6): 667-676.
LIN J, ZHOU X, TANG KX, et al., 2004. A survey of the studies on the resources of *Jatropha curcas* L. [J]. J Trop Subtrop Bot, 12(3): 285-290.
LU ZH, HUO JQ, MA Y, et al., 2017. Genome-wide identification and expression analysis of the *CIPK* gene family in grape [J]. Acta Agr Boreali-occidentalis Sinica, 26(11): 1619-1630. [路志浩，霍建强，马钰，等, 2017. 葡萄 *CIPK* 基因家族的鉴定表达分析 [J]. 西北农业学报, 26(11): 1619-1630.]
MAKKAR HPS, BECKER K, 2009. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts [J]. Eur J Lipid Sci Tech, 111(8): 773-787.
MORRISSY AS, MORIN RD, DELANEY A, et al., 2009. Next-generation tag sequencing for cancer gene expression profiling [J]. Genome Res, 19(10): 1825-1835.
NAGAE M, NOZAWA A, KOIZUMI N, et al., 2003. The Crystal strueture of the novel Caleium-binding protein at CBL from *Arabidopsis thaliana* [J]. J Biol Chem, 278(43): 42240-42246.
NIU LL, DONG BY, SONG ZH, et al., 2018. Genome-wide identification and characterization of *CIPK* family and analysis responses to various stresses in apple (*Malus domestica*) [J]. Int J Mol Sci, 19(7): 2131.
OHTA M, GUO Y, HALFTER U, et al., 2003. A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2 [J]. P Natl Acad Sci USA, 100(20): 11771-11776.
QUAN R, LIN H, MENDOZA I, et al., 2007. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress [J]. Plant Cell, 19(4): 1415-1431.
SANCHEZ-BARRENA MJ, FUJII H, ANGULO I, et al., 2007. The structure of the C-terminal domain of the protein kinase AtSOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3 [J]. Mol Cell, 26(3): 427-435.
SANCHEZ-BARRENA MJ, MARTINEZ-RIPOLL M, ZHU JK, et al., 2005. The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: Molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response [J]. J Mol Biol, 345(5): 1253-1264.
SANDERS D, PELLOUX J, BROWNLEE C, et al., 2002. Calcium at the cross-roads of signaling [J]. Plant Cell, 14: S401-417.
SANYAL SK, RAO S, MISHRA LK, et al., 2016. Plant stress responses mediated by CBL-CIPK phosphorylation network [J]. Enzymes, 40: 31-64.
SATO S, HIRAKAWA H, ISOBE S, et al., 2011. Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L. [J]. DNA Res, 18(1): 65-76.
SCRASE-FIELD S, KNIGHT MR, 2003. Calcium: just a chemical switch [J]. Curr Opin Plant Biol, 6(5): 500-506.
SHI J, KIM KN, RITZ O, et al., 1999. Novel protein kinase sassociated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 11(12): 2393-2406.
SUN T, WANG Y, WANG M, et al., 2015. Identification and comprehensive analyses of the *CBL* and *CIPK* gene

ChinaXiv合作期刊

families in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. BMC Plant Biol, 15: 269.
THOEN PA, ARIYUREK Y, THYGESEN HH, et al., 2008. Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms [J]. Nucleic Acids Res, 36(21): e141.
WANG AX, LIU SY, 2018. Identification and bioinformatics analysis on *CIPK* gene family in tomato [J]. J Northeast Agric Univ, 49(2): 31-38. [王傲雪, 刘思源, 2018. 番茄 *CIPK* 基因家族鉴定及生物信息学分析 [J]. 东北农业大学学报, 49(2): 31-38.]
WANG HB, ZOU ZR, WANG SS, et al., 2014. Deep sequencing-based transcriptome analysis of the oil-bearing plant Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) under cold treatments [J]. Plant omics, 7(3): 178-187.
WANG HB, ZOU ZR, WANG SS, et al., 2013. Global analysis of transcriptome responses and gene expression profiles to cold stress of *Jatropha curcus* L. [J]. PLoS ONE, 8(12): e82817.
WEINL S, KUDLAJ, 2009. The CBL-CIPK Ca^{2+}-decoding signaling network: function and perspectives [J]. New Phytol, 184(3): 517-528.
WU PZ, ZHOU CP, CHENG SF, et al., 2015. Integrated genome sequence and linkage map of physic nut (*Jatropha curcas* L.), a biodiesel plant [J]. Plant J, 81(5): 810-821.
XIONG Y, HUANG Y, XIONG LZ, 2007. Characterization of stress-responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement [J]. Plant Physiol, 144(3): 1416-1428.
YU YH, XIA XL, YIN WL, et al., 2007. Comparative genomic analysis of *CIPK* gene family in *Arabidopsis* and Populus [J]. Plant Growth Regul, 52(2): 101-110.
ZHANG H, YANG B, LIU WZ, et al., 2014. Identification and characterization of *CBL* and *CIPK* gene families in canola (*Brassica napus* L.) [J]. BMC Plant Biol, 14: 8.
ZHANG HC, YIN WL, XIA XL, 2008. Calcineurin B-like family in populus: comparative genome analysis and expression pattern under cold, drought and salt stress treatment [J]. Plant Growth Regul, 56(2): 129-140.
ZHU JK, 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants [J]. Annu Rev Plant Biol, 53: 247-273.
ZHU K, CHEN F, LIU J, et al., 2016. Evolution of an intron-poor cluster of the *CIPK* gene family and expression in response to drought stress in soybean [J]. Sci Rep, 6: 28225.

chinaXiv:202112.00154v1